

Über die Hitzedenaturierung von Invertase nach Röntgenbestrahlung

von
Christa Eggert
aus Berlin

Aus dem Institut für Physikalische und Medizinische
Strahlenkunde der Universität Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Prof. Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly

ÜBER DIE HITZEDENATURIERUNG VON INVERTASE
NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Christa Eggert
aus Berlin

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. A. Kröncke

Referent: Professor Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 2. 69

A Einleitung und Problemstellung

B Methodik

Hefepräparat

Aufarbeitung

Bestrahlungsbedingungen

Temperaturinaktivierung

a Invertase-Reaktion

b Glukose-Farbttest

C Ergebnisse

D Diskussion

E Zusammenfassung

F Literatur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A Einleitung und Problemstellung

Bestrahlt man teilungsfähige pflanzliche oder tierische Zellen mit ionisierenden Strahlen, so verlieren die Zellen ihre Teilungsfähigkeit und sterben schließlich ab, wenn die verabfolgte Strahlendosis hinreichend groß war. Das Schicksal einer bestrahlten Zelle hängt jedoch nicht nur von der Strahlendosis ab, sondern auch von den Bestrahlungsbedingungen wie Dosisleistung, Sauerstoffgehalt, Temperatur, Stoffwechsel und Behandlung nach der Bestrahlung. Um die Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit einer Zelle von den Versuchsbedingungen verstehen zu können, ist es notwendig, die Prozesse zu verfolgen, die von der Absorption der Strahlungsenergie durch Anregung und Ionisation über die schnellen physikalisch-chemischen Zwischenreaktionen zu biochemischen Änderungen und schließlich zum sichtbaren biologischen Effekt führen. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, den Strahleneffekt durch Beeinflussung einer beliebigen Zwischenreaktion zu verstärken oder abzuschwächen. Wird der Strahleneffekt abgeschwächt, so spricht man von dem Vorliegen eines biologischen oder chemischen Strahlenschutzes. Wird dagegen der Strahleneffekt durch eine Behandlung der Zelle während oder nach der Bestrahlung verstärkt, so bezeichnet man diesen Vorgang als "Strahlensensibilisierung" bzw. Ausschaltung der Erholungsfähigkeit. Im allgemeinen verlaufen diese Prozesse auf der Ebene des Stoffwechsels (1,2,3,). In den letzten Jahren wurde bekannt, dass

schon bei isolierten Makromolekülen der Strahleneffekt von der Behandlung der Moleküle nach der Bestrahlung abhängt. So zeigten Wohlhieter et al.(4), dass der noch infektiöse Bruchteil der Ribonukleinsäure vom Tabakmosaik-Virus nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen hitzelabiler ist als unbestrahlte Ribonukleinsäure. Ejodus und Mitarbeiter (5,6,7,8, 9,10) konnten ähnliche Effekte an Pepsin und Myosin nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wird das Enzym Invertase in getrockneten Hefezellen untersucht. Es stellte sich heraus, dass Invertasemoleküle, die eine Strahlendosis von 20 Megarad "überlebt", d.h. ihre enzymatische Fähigkeit noch nicht eingebüßt haben, schon erhebliche strukturelle Veränderungen erlitten haben müssen. Diese "latenten Läsionen" sind Ursache einer größeren Hitzelabilität des bestrahlten "überlebenden" Moleküls verglichen mit unbestrahlter Invertase. Bestrahlung mit energiereichen Strahlen hat demnach einen bestimmten Bruchteil der Enzymmoleküle sofort inaktiviert. Bei einem anderen Bruchteil sind latente, durch den üblichen Enzymtest nicht messbare Strukturveränderungen vorhanden. Ein weiterer Bruchteil ist unverändert und identisch mit unbestrahlten Molekülen. Die Größe der jeweiligen Bruchteile an der Gesamtzahl der Enzymmoleküle hängt verständlicherweise von der Strahlendosis und den Bestrahlungsbedingungen ab.

Das Enzym Invertase ist an der Außenfläche der zytoplasmatischen Membran der Hefezelle lokalisiert (Demis et al.(11)). So kann eine quantitative Bestimmung der Invertaseaktivität in einer Suspension von Hefezellen durchgeführt werden, ohne dass die

Zellen vorher aufgebrochen werden müssen. Vorversuche mit gereinigter Invertase (National Biochemical Corporation) zeigten, dass die in dieser Arbeit untersuchte Hitzelabilisierung des Enzyms nach Bestrahlung ebenfalls nachweisbar und somit nicht an die Anwesenheit der Hefezelle gebunden ist. Der Effekt ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der Invertase in unserer schonend getrockneten Hefe. Eine Analyse der Messergebnisse zeigte, dass dies auf bereits vorhandene, durch die Isolierung verursachte "latente Schäden" zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde wurden hier Versuche mit Invertase in Trockenhefe durchgeführt.

B Methodik

Hefepräparat

500 Gramm frische Bäckerhefe der Fa. Moormann/Werne a. d. Lippe wurden drei Tage lang im Abzug bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Die getrocknete Hefe - in Zukunft als Trockenhefe bezeichnet - enthielt nach diesem Trocknungsprozess noch etwa 10% Wasser. Dieser Anteil wurde durch Trocknung bei 110° C bestimmt. Die Trockenhefe wurde während der ganzen Versuche in einer Plastikflasche bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Aufarbeitung

Für jeweils einen Bestrahlungsversuch wurden 70 mg der Trockenhefe in einem Aluminium-Schälchen mit Röntgenstrahlen bestrahlt. Anschließend wurde zu je 10 mg bestrahlter Trockenhefe 1 ml M/1500 Soerensen-Phosphat-Puffer pH 6,8 gegeben und somit eine 1% Stammsuspension hergestellt.

Ansatz und Mischung erfolgte in einem Glashomogenisatorgefäß nach "Potter-Elvehjem". Während des Suspendierens und für die Zeit bis zur Weiterverarbeitung wurde die Stammsuspension bei 0° C aufbewahrt, um eine Temperaturinaktivierung, die unter Umständen bei Zimmertemperatur hätte auftreten können, zu vermeiden. Durch Kontrollversuche wurde sichergestellt, dass sich die Enzymaktivität während der Aufbewahrungszeit bei 0° C nicht veränderte.

Bestrahlungsbedingungen

Die Bestrahlung wurde mit einer "Dermopan-Röhre" der Fa.Siemens-Reiniger mit einem Berylliumfenster von 1 mm Dicke ohne Zusatzfilter vorgenommen. Der Abstand vom Fokus bis zur Mitte des Objektes betrug 12,3 mm. An diesem Punkt war bei 50 kV Röhrenspannung und 25 mA Röhrenstrom eine Dosisleistung von $22,5 \times 10^5$ rad/Min.vorhanden.Die Dosisleistung wurde auf kalorimetrischem Wege bestimmt(12).*)

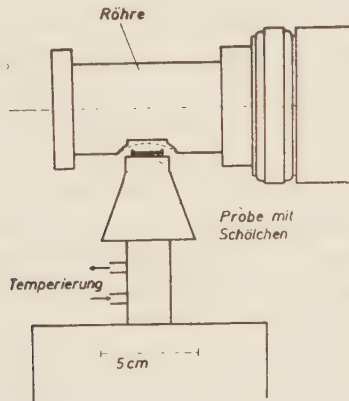


Abb.1 Bestrahlungsanordnung

In Abb.1 ist die Bestrahlungsanordnung dargestellt. Das Aluminium-Schälchen mit der Probe befand sich auf der Oberfläche einer Probenhalterung, die durch

*)Die Dosierung wurde von Herrn Dipl.Phys.Th.Schmidt in dankenswerter Weise durchgeführt.

einen Thermostaten auf 20°C gehalten wurde. Die verwendeten Aluminium-Schälchen bestanden aus 0,5 mm starkem Aluminiumblech und hatten einen Außendurchmesser von 15 mm. Die Innenhöhe der Schälchen betrug 1 mm. Die Trockenhefe lag in einer mittleren Schichtdicke von 0,5 mm zur Bestrahlung vor.

Temperaturinaktivierung

Die Temperaturinaktivierung wurde in einem automatisch reguliertem Wasserbad (Thermomix II der Fa. Braun/Melsungen) in Versuchsreihen von 42°C bis 56°C für vorbestrahlte Invertase und von 56°C bis 68°C für das unbestrahlte Enzym durchgeführt. Die Inaktivierungszeiten lagen zwischen 4 Sekunden und 80 Minuten.

Die Temperaturinaktivierung fand in 11 dünnwandigen Jenaer-Glasröhrchen je Versuchsreihe statt, die mit je 3 ml M/300 Soerensen-Phosphat-Puffer pH 6,8 gefüllt waren und mit Parafilm verschlossen wurden. Vor Inkubation mit der Stammsuspension befanden sich die Röhrchen etwa 10 Minuten zum Temperaturausgleich im Wasserbad bei der gewünschten Versuchstemperatur. Nach Beendigung der jeweiligen Inaktivierungszeit wurde die erhitzte Stammsuspension in einem im Eiswasserbad stehenden V_2A -Stahlbecher schnell abgekühlt und anschließend in ihr jeweiliges Probenröhrchen zurückgegossen. Die inaktivierten Proben wurden wieder mit Parafilm verschlossen und zu dem in jeder Versuchsreihe mitlaufenden - nicht temperaturinaktivierten - Nullwert in das Eisbad gestellt. Bei Proben mit Temperaturinaktivierungszeiten über 10 Minuten wurden die Reagenzgläser direkt im Eiswasserbad abgekühlt.

Bestimmung der Invertaseaktivität

a) Invertasereaktion

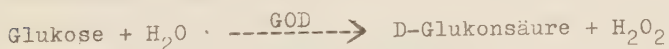
Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Invertase geschah auf folgende Weise : je 1 ml der vorbestrahlten und temperaturinaktivierten Suspensionen wurde in ein Reagenzglas pipettiert, das sich in einem Wasserbad bei 25° C befand. Zu jedem Röhrchen wurden 5 ml Saccharose-Puffer gegeben. Der Saccharose-Puffer enthielt 2,5% Saccharose in 0,01 molarem Azetat-Puffer pH 4,8 . Mit der Zugabe des Saccharose-Puffers wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach 20 Minuten wurde die enzymatische Spaltung der Saccharose durch Zugabe von 5 ml 0,1 normaler Natronlauge gestoppt.

Die Menge der in 20 Minuten freigesetzten Glukose ist ein Maß für die Aktivität der Invertase in der betrachteten Probe. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die erzeugte Glukose proportional der Menge Trockenhefe ist und dass ebenfalls die Glukosemenge linear mit der Saccharose-Inkubationszeit ansteigt.

b) Glukose-Farbttest

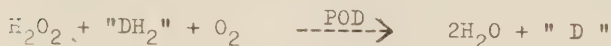
Um die in 20 Minuten gebildete Menge Glukose bestimmen zu können, wurde die Biochemica Test-Combination "Blutzucker-Farb-Test TC M III" der Fa. Boehringer/Mannheim verwendet, die auf folgendem Prinzip beruht (13) :

das Enzym Glukose-Oxydase (GOD) katalysiert die Oxydation von β -D-Glukose zu Gluconolacton, das weiter mit Wasser zu Glukonsäure reagiert

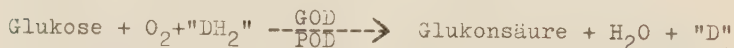


Das hierbei entstehende H_2O_2 oxydiert unter enzy-

matischer Katalyse durch Peroxydase (POD) den wasserstoffdonator " DH₂ ", der dabei in den rot-braunen Farbstoff " D " übergeht



Der Gesamtablauf kann folgendermaßen dargestellt werden



Dieser Test, der ursprünglich für den klinischen Gebrauch bestimmt ist, mußte für die hier vorliegenden Erfordernisse modifiziert werden. Es entfiel bei den hier besprochenen Versuchen die Enteiweißung, weil in den Proben durch den hohen Invertasegehalt der Hefe nur Spuren Eiweißkörper vorhanden sind. Es konnte gezeigt werden, dass der Proteingehalt der Hefezellen den Versuchsablauf nicht störte.

Der in der Testkombination enthaltene Glukose-Standard war für diesen Versuchsablauf ebenfalls nicht geeignet, weil er auf das saccharosefreie Blutserum eingestellt ist. Deshalb wurde ein eigener Glukose-Standard hergestellt, der aus 6 ml 0,01% Glukose-Lösung plus 5 ml der bereits beschriebenen Saccharose-Puffer-Lösung besteht und somit in seiner Zusammensetzung und seinen Mengenverhältnissen genau unserer Methodik entsprach. Mit diesen Änderungen konnte der Glukose-Farbstest nach der Vorschrift der Fa.Boehringer benutzt werden.

Zu 0,2 ml der Untersuchungslösung wurden im Wasserbad von 25° C 5 ml des nach Vorschrift angesetzten Glukose-Reagenz pipettiert. Es war darauf zu achten, dass die Extinktionsablesung genau 35 Minuten nach dem Beginn der Farbreaktion erfolgte.

Nach Ablauf der Farbentwicklung wurde die Extinktion der Proben im Photometer-Eppendorf bei einer Wellenlänge von 436 nm in Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Diese Extinktion wurde dann mit den gleichzeitig zu Beginn und zu Ende des Versuches gemessenen Glukose-Standards verglichen. Auf diese Weise wurde die in 20 Minuten bei 25° C entwickelte Glukosemenge pro Milliliter der Untersuchungslösung berechnet.

Ein Leerwert, der 5 ml der schon bekannten Saccharose-Puffer-Lösung und 6 ml Wasser enthielt, diente dazu, das Photometer vor Beginn der Messung auf die Extinktion Null einzustellen. Mit Hilfe dieses Leerwertes konnte somit die Grundextinktion abgezogen werden, die durch die Anwesenheit der Saccharose sowie durch die Eigenextinktion der Lösung und durch die Reflexion der Küvette bedingt war.

Auf Grund der vorliegenden Versuchsanordnung wurde folgende Maßeinheit " B " für die Invertase-Aktivität definiert :

Eine Aktivität von $B = 1$ liegt dann vor, wenn 1 Mikrogramm Trockenhefe in 20 Minuten bei 25° C bei dem verwendeten Saccharose-Puffer pH 4,8 genau 1 Mikrogramm Glukose freisetzt.

C Ergebnisse

Zunächst wurde die Invertase in der Trockenhefe auf ihre Strahlenempfindlichkeit untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Proben des Präparates mit unterschiedlichen Röntgenstrahlendosen bestrahlt und die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Invertase von der applizierten Strahlendosis gemessen.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb.2 dargestellt. Die Abbildung stellt den Mittelwert der Einzelmessung und den mittleren Fehler aus drei Versuchen dar. Man erkennt in dieser halblogarithmischen Darstellung, dass die Aktivität der Invertase exponentiell mit der Dosis abnimmt. Diese exponentielle Dosisabhängigkeit ist, wie die eingezeichneten Fehler zeigen, gut gesichert.

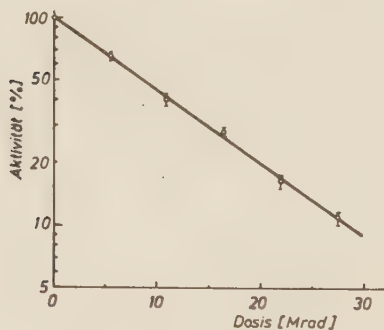


Abb.2 Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Invertase von der Röntgenstrahlendosis. Es ist der mittlere Fehler der Einzelmessung angegeben.

Die Inaktivierungsdosis (D_{37}) liegt bei 12,5 Megarad. Das Enzym ist in trockenem Zustand außerordentlich strahlenresistent. Es entspricht in dieser Hinsicht jedoch anderen Enzymen, bei denen in trockenem Zustand etwa gleichgroße Röntgenstrahlendosen appliziert werden müssen, um einen ähnlichen Effekt zu erzielen.

Für alle folgenden Untersuchungen wurde eine Röntgenstrahlendosis von 20 Megarad gewählt, die die Enzymaktivität auf etwa 20% reduziert, sofern die Invertase in kalter Puffer-Lösung aufgearbeitet und bis zum Test bei 25° C kein Hitzeschritt eingeschaltet wurde.

Bei einer Restaktivität von rund 20% nach Vorbestrahlung war zu erwarten, dass in allen bestrahlten Enzymmolekülen ein gewisser Energiebetrag deponiert wurde, der bereits 80% der Moleküle sofort inaktivierte.

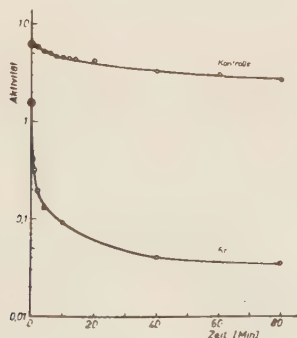


Abb.3 Invertaseaktivität in B-Werten (s.Text) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei einer Inaktivierungstemperatur von 56° C.
Kontrolle: ohne Vorbestrahlung;
Rö.: nach Bestrahlung mit einer Dosis von 20 Megarad Röntgenstrahlen.

Die Abhängigkeit des Aktivitätsverlustes von der Dauer der Inkubationszeit bei 56°C wird in Abb. 3 gezeigt. Auf der Ordinate sind die in dieser Arbeit verwendeten Einheiten für die Aktivität aufgetragen. Der experimentelle Ablauf dieser Versuche wurde bereits im Abschnitt "Methodik" beschrieben.

Die obere Kurve beginnt bei einem Aktivitätswert von 6 und stellt die unbestrahlte Kontrolle dar. Man sieht, dass bei 56°C die Aktivität mit der Dauer der Inkubationszeit abnimmt und zwar bis auf einen Aktivitätswert von etwa 2,5 bis 3. Die Hitzeinaktivierung geht in den ersten 20 Minuten etwas schneller vor sich als in den restlichen 60 Minuten.

Betrachtet man dagegen die mit 20 Megarad vorbe-strahlten Invertaseproben, so sieht man zunächst, dass zum Zeitpunkt 0 die Restaktivität 1,6 in den hier benutzten Aktivitätseinheiten beträgt, entsprechend 20% der Ausgangsaktivität der unbestrahlten Enzymmoleküle. Nach wenigen Sekunden Inkubation bei einer Temperatur von 56°C ist schon ein außerordentlich großer Aktivitätsverlust eingetreten. Nach 2 bis 3 Minuten beträgt die Aktivität nur noch 10% der Ausgangsaktivität. Der weitere Aktivitätsabfall ist dann mit zunehmender Zeit geringer. Man erkennt wieviel hitzeempfindlicher die vorbestrahlte Invertase bei einer Temperatur von 56°C verglichen mit der Kontrolle ist. Während zum Zeitpunkt 0, d.h. ohne Hitzebehandlung, die bestrahlte Probe noch $1/5$ der Aktivität der Kontrolle besitzt, ist sie nach 80 Minuten langer Erhitzung auf etwa $1/100$ abgesunken.

Da der steile Abfall der vorbestrahlten Invertase so außerordentlich schnell erfolgte und in seinen Einzelphasen in Abb.3 nicht zu übersehen ist, wurde der gleiche Versuch in Abb.4 noch einmal mit anderer Zeitskala aufgetragen. Es ist nur der Aktivitätsverlauf in den ersten 5 Minuten dargestellt.

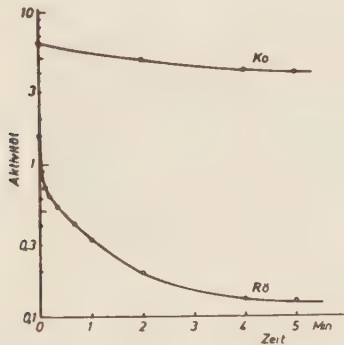


Abb.4 Ausschnitt aus Abb. 3 für die Inkubationszeit von 0 bis 5 Minuten.

Man erkennt auch hier, dass die Kontrolle mit zunehmender Inkubationszeit nur wenig inaktiviert wird, während die Aktivität der vorbestrahlten Invertase sehr schnell absinkt.

Aus diesem Experiment folgt, dass durch die Bestrahlung Veränderungen im Invertasemolekül induziert wurden, die bei schonender Behandlung der Invertase nach der Bestrahlung nicht zu erkennen sind. Diese treten aber nach einer anschließenden Hitzebehandlung deutlich in Erscheinung.

Um die Reaktionskinetik der Hitzeinaktivierung von unbehandelter und bestrahlter aber noch aktiver Invertase untersuchen zu können, mußten Messungen nach Behandlung bei verschiedenen Inkubationstemperaturen durchgeführt werden.

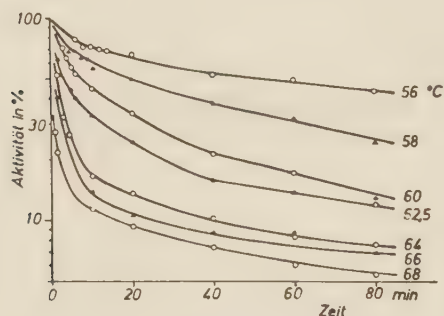


Abb.5 Aktivität unbestrahlter Invertase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei verschiedenen Inaktivierungstemperaturen.

In Abb.5 sind die Temperaturinaktivierungskurven für die nicht bestrahlte Invertase in der Trockenhefe aufgetragen, in Abb.6 die entsprechenden Kurven für die mit 20 Megarad vorbestrahlte Invertase. Die Ordinate zeigt im halblogarithmischen Maßstab die enzymatische Aktivität in Prozenten von dem jeweiligen Wert, der ohne Hitzeeinwirkung gemessen wurde. Dadurch wurden beide Kurven normiert. Bei der unbestrahlten Hefe (Abb.5) entsprechen 100% einem B-Wert von 6,38, bei der vorbestrahlten Hefe (Abb.6) entspricht der 100%-Wert einem B-Wert von 1,52. Beide Kurvenscharen

zeigen einen ähnlichen Verlauf. Vergleicht man jedoch die Temperaturen, die zu einer bestimmten Geschwindigkeit der Hitzedenaturierung geführt haben, so erkennt man, dass zur Inaktivierung unbestrahlter Invertase sehr viel höhere Temperaturen erforderlich sind.

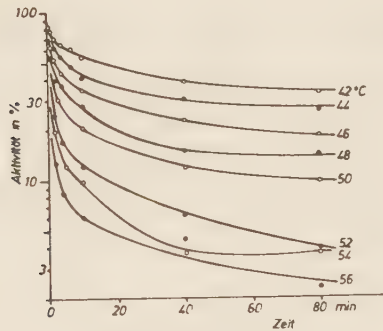


Abb.6 Aktivität von vorbestrahlter Invertase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei verschiedenen Inaktivierungstemperaturen.

Die verwendeten Temperaturen gehen aus den beiden Abbildungen hervor. Beiden Kurvenscharen ist gemeinsam, dass die Aktivität zunächst sehr schnell absinkt, um dann langsam einem annähernd stationären Restwert der Aktivität nach rund 60 bis 80 Minuten zuzustreben.

Ein Maß für die Geschwindigkeit der Temperaturinaktivierung ist die Zeit, in der die Aktivität auf 50% der Anfangsaktivität abgesunken ist. Diese

Zeit wird hier als Halbwertszeit (HWZ) bezeichnet. Die Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Inaktivierungstemperatur ist in Abb.7 dargestellt. Auf der Ordinate ist die Halbwertszeit halblogarithmisch gegen die Inaktivierungstemperatur aufgetragen.

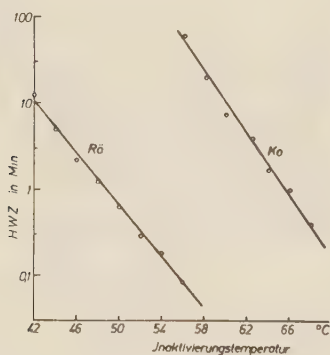


Abb.7 Halbwertszeit (HWZ) in Abhängigkeit von der Inaktivierungstemperatur.

Man erkennt, dass die beiden Kurven sich deutlich voneinander unterscheiden und dass eine sehr starke Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeiten von der Temperatur vorliegt. Dieses gilt sowohl für das bestrahlte als auch für das unbestrahlte Präparat.

Wie bei der überwiegenden Zahl chemischer Reaktionen, ist der Temperaturkoeffizient außerordentlich groß. Der Unterschied zwischen beiden Kurven ist lediglich darin zu suchen, dass nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen im enzymatisch aktiven Bruchteil der gleiche Effekt bereits bei sehr viel niedrigeren Temperaturen auftritt.

Theoretische Behandlung der Inaktivierungskurven

Eine, in halblogarithmischer Darstellung nach unten durchgebogene Kurve kann formal als eine Summe von Exponentialfunktionen beschrieben werden. Sie lautet:

$$(1) B = a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t} + a_3 e^{-k_3 t} + a_4 e^{-k_4 t} + a_5 e^{-k_5 t}$$

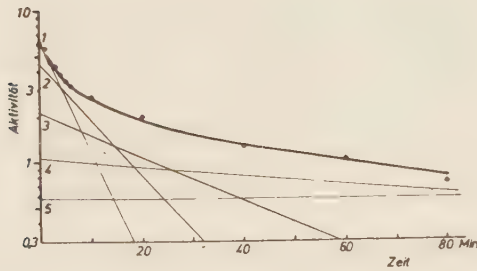


Abb.8 Zerlegung der Inaktivierungskurve in 5 verschiedene Komponenten nach Gleichung (1)s.Text.

In dieser Formel entspricht jedem Glied der Summe

aus 5 Gliedern eine bestimmte Molekülfraktion mit einer bestimmten Temperaturempfindlichkeit. Der Faktor a (a_1, a_2, a_3, a_4, a_5) gibt den Anteil der betreffenden Molekülfraktion an der gesamten Population an. Die Größen k_1, k_2, k_3, k_4 und k_5 sind Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der hier als monomolekular angenommenen Reaktion. Die Größen a und k wurden so gewählt, dass die experimentellen Kurven durch Gleichung (1) möglichst gut dargestellt wurden. Als Beispiel für dieses Vorgehen ist in Abb.8 eine experimentelle Kurve zusammen mit 5 verschiedenen Geraden, die den 5 verschiedenen Komponenten der Gleichung (1) entsprechen, dargestellt. Summiert man diese 5 Geraden, so erhält man die in dieser Abbildung dargestellte gemessene Kurve.

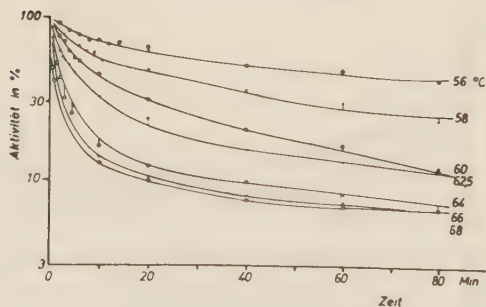


Abb.9 Meßwerte aus Abb.5 und theoretisch errechnete Kurven für die Inaktivierung nicht bestrahlter Invertase in Abhängigkeit von der Zeit.

Aus Abb.9 und Abb.10 ist die Güte der theoretischen Anpassung zu ersehen. In Abb.9 sind noch einmal die gemessenen Werte für die nicht bestrahlte Hefe in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

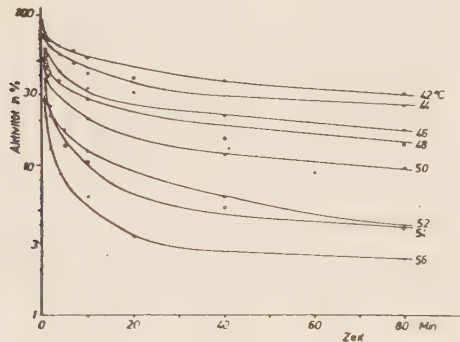


Abb.10 Messwerte aus Abb.6 und theoretisch errechnete Kurven für die Inaktivierung von bestrahlter Invertase in Abhängigkeit von der Zeit.

Im Gegensatz zu der anfangs gezeigten Abb.5 sind die hier durchgezogenen Kurven die berechneten Kurven entsprechend Gleichung (1). In Abb.10 sind die berechneten Kurven für bestrahlte Hefe dargestellt.

Den beiden nächsten Tabellen sind die k -Werte und a -Werte sowohl für die Kontrollen als auch für die bestrahlte Invertase zu entnehmen.

Man erkennt, dass die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k mit der Temperatur stark zunehmen, wie es für eine chemische Reaktion zu erwarten ist.

Tabelle 1

Temp. °C	Geschwindigkeitskonstanten [Min. ⁻¹]				
	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	k ₅
56	0,425	0,028	-----	-----	-----
58	0,46	0,053	0,015	-----	-----
60	0,47	0,13	0,03	0,012	-----
62,5	1,0	0,22	0,075	0,01	-----
64	3,22	0,45	0,22	0,045	-----
66	5,0	0,91	0,3	0,06	0,0003
68	5,0	1,83	0,6	0,065	0,0006

Werte für die Geschwindigkeitskonstanten k₁, k₂, k₃, k₄, k₅ für unbestrahlte Invertase in Abhängigkeit von der Inaktivierungstemperatur. Die Anpassung erfolgte mit folgenden Werten für a / B₀ in Prozenten (siehe Gleichung (1)) :

$$a_1 / B_0 = 20,0 \%$$

$$a_2 / B_0 = 40,0 \%$$

$$a_3 / B_0 = 20,0 \%$$

$$a_4 / B_0 = 13,0 \%$$

$$a_5 / B_0 = 7,0 \%$$

$$(B_0 = 6,38)$$

Tabelle 2

Temp. [° C]	Geschwindigkeitskonstanten [Min. ⁻¹]				
	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	k ₅
42	1,41	0,051	0,002	-----	-----
44	2,5	0,1	0,006	-----	-----
46	7,0	0,33	0,02	0,003	-----
48	10,0	0,6	0,035	0,005	-----
50	27,0	1,1	0,104	0,014	-----
52	46,5	2,5	0,45	0,043	-----
54	104,92	3,97	0,462	0,11	0,0065
56		5,58	1,06	0,30	0,0341

Werte für die Geschwindigkeitskonstanten k₁, k₂, k₃, k₄, k₅ für bestrahlte Invertase in Abhängigkeit von der Inaktivierungstemperatur. Die Anpassung erfolgte mit folgenden Werten für a / B₀ in Prozenten (siehe Gleichung (1)) :

$$a_1 / B_0 = 30,0 \%$$

$$a_2 / B_0 = 37,7 \%$$

$$a_3 / B_0 = 16,6 \%$$

$$a_4 / B_0 = 10,0 \%$$

$$a_5 / B_0 = 6,6 \%$$

$$(\cdot B_0 = 1,52)$$

Weiter ist zu sehen, dass die Geschwindigkeitskonstanten für die bestrahlten Enzymmoleküle wesentlich größer sind als für die unbestrahlten und zwar um den Faktor 100 bis 1000. Dieser Sachverhalt ging bereits aus Abb.7 hervor, in der die Halbwertszeit in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen worden ist. Obwohl die Halbwertszeit eine Funktion aller a - und k -Werte (Gleichung (1)) ist, ist die Erhöhung der Hitzeinaktivierungsrate um den Faktor 1000 und die starke Temperaturabhängigkeit der Hitzedenaturierungsgeschwindigkeit deutlich zu erkennen.

D Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Strahlenwirkung und die Hitzedenaturierung auf das Enzym Invertase untersucht. Es ließen sich nach Bestrahlung zwei Effekte nachweisen. Der erste Effekt tritt nach den hier vorliegenden Bedingungen sofort ein und führt zu einer unmittelbaren Inaktivierung des Enzymmoleküls. Außerdem kann man aber noch einen zweiten Strahleneffekt an den Molekülen nachweisen, die nicht sofort inaktiviert wurden. Hierbei wird es sich wahrscheinlich um solche Moleküle handeln, in denen der deponierte Energiebetrag geringer war als bei den Molekülen, die sofort inaktiviert wurden.

Die wesentlich schnellere Temperaturinaktivierung der nach Bestrahlung mit etwa 20 Megarad noch aktiven Moleküle spricht dafür, dass an den Molekülen bereits gewisse strukturelle Veränderungen vorhanden sind oder chemische Gruppen verändert wurden. Verständlicherweise läßt sich über die Natur dieser Änderungen am Molekül nichts aussagen. Sie finden aber ihren Ausdruck in einer wesentlich größeren Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Hitzeinaktivierung dieses Enzyms. Obwohl die Hitzeinaktivierung des nach der Bestrahlung noch vorhandenen Aktivitätsrestes 1000 mal schneller verläuft als bei den Kontrollen, ist - wie aus Abb. 7 hervorgeht - die Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung praktisch unverändert. Die Temperaturabhängigkeit ist sehr groß. Aus Abb. 7 kann man entnehmen, dass die Inaktivierungsgeschwindigkeit bei einer Temperatursteigerung

um 10 Grad C auf das 20-fache steigt. Diese starke Temperaturabhängigkeit ist typisch für die normale Hitzedenaturierung von Proteinen im Gegensatz zu strahlenchemischen Reaktionen, die oft nur eine kleine Temperaturabhängigkeit zeigen.

E Zusammenfassung

Invertase in luftgetrockneter Hefe wurde mit 50 kV-Röntgenstrahlung bestrahlt. Anschließend wurde die Hitzeinaktivierung des noch aktiven Enzymanteiles in Suspension bei Temperaturen zwischen 42° C und 68° C gemessen und mit dem Verhalten des unbestrahlten Enzyms verglichen. Es zeigte sich, dass die Hitzeinaktivierung des Enzymrestes nach Bestrahlung 1000 mal schneller verläuft als bei unbestrahlter Invertase. Daraus folgt, dass nach Bestrahlung nicht nur ein Teil der Enzymmoleküle vollständig strahleninaktiviert ist, sondern dass auch der sogenannte "überlebende" Teil bereits strukturelle Veränderungen aufweist, die zwar noch nicht zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität geführt haben, jedoch eine erhebliche Steigerung der Hitzelabilität verursachen.

F Literatur

-
- (1) HOLLAENDER, A. (ed) :
Radiation Biology, Bd. I-III,
McGraw-Hill Book Co., New York, (1954-1956)
 - (2) HOLLAENDER, A. (ed) :
Radiation Protection and Recovery,
Pergamon Press, Oxford, (1960)
 - (3) SILINI, G. (ed) :
Radiation Research,
North-Holland Publ. Co., Amsterdam, (1967)
 - (4) WOHLHIETER, J. A., A. BUZZEL and M. A. LAUFFER :
Biochim. Biophys. Acta 43, 163 (1960)
 - (5) GANASSI, E. E., N. V. KONDAKOVA, G. S. OTAROWA,
L. CH. EJDUS :
Radiobiologija 1, 14 (1961)
 - (6) GANASSI, E. E., L. CH. EJDUS, R. A. ARIFULINA :
Radiobiologija 4, 41 (1964)
 - (7) GANASSI, E. E., E. N. SARCH, N. V. KONDAKOVA,
L. CH. EJDUS :
Biofizika, (USSR) 10, 966 (1965)
 - (8) EJDUS, L. CH. :
Biofizika, (USSR) 11, 217 (1966)
 - (9) VLADIMIROV, U. A., T. N. KALABUKHOVA, N. V. KONDAKOVA,
N. I. PERASSE, L. CH. EJDUS :
studia biophysica im Druck
 - (10) KALABUKHOVA, T. N., N. V. KONDAKOVA, L. CH. EJDUS :
studia biophysica im Druck

- (11) DEMIS, D.J., A. ROTHSTEIN and R. NEIER :
Arch. Biochem. Biophys. 48, 55 (1954)
- (12) PAULY, H. :
Strahlentherapie, 110, 462 (1962)
- (13) BERGMEYER, H. U. u. E. BERNT :
Methoden der enzymatischen Chemie,
Verlag Chemie, Weinheim (1962)
- (14) GLASSTONE, S., K. J. LAIDLER and H. EYRING :
The Theory of Rate Processes,
McGraw-Hill, New York (1941)
- (15) POLLARD, E., W. F. POWELL and S. H. REAUME :
Proc. Natl. Acad. Sci., (USA) 38, 173 (1952)

Herrn Professor Dr.H.Pauly möchte ich für die großzügig gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Ebenfalls bin ich Frau G.Schedl für die gewissenhafte Durchführung der Berechnungen wie auch allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Strahlenkunde, die durch Diskussionen und Ratschläge den Verlauf der Arbeit gefördert haben, sehr zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 1.5.1927 als Tochter des Dipl.-Ing. Kurt Eggert und seiner Ehefrau Ilse in Berlin geboren, legte ich nach vierjähriger Volksschulzeit und anschließendem Besuch des Eichendorff-Oberlyzeums das um ein halbes Jahr vorverlegte Abitur im Herbst 1944 ab und wurde für das Sommersemester 1945 an der Medizinischen Fakultät in Berlin vorimmatrikuliert. Die Ableistung eines halben Jahres Arbeitsdienst war Voraussetzung für die Aushändigung des Abiturzeugnisses und den Studienbeginn.

Durch Flucht und Nachkriegsereignisse kamen wir im Sommer 1945 in den Hamburger Raum, wo ich mich sofort um Zulassung zum Wintersemester 1945 bemühte. Eine zweijährige Aufbauarbeit - zu der auch Krankenpflege zählte - war Voraussetzung zur Zulassung für Nicht-Hamburger. So lernte ich in der Hamburger Universitätsklinik die große Krankenpflege und beendete die zweijährige Ausbildung mit dem Abschlußexamen. Bei erneuter Bewerbung um Zulassung zum Studium wurde festgestellt, daß nun das Abitur nicht mehr gültig sei. So nahm ich an einem Ergänzungskurs der Hamburger Hochschulbehörde teil und legte im Oktober 1948 noch einmal die Reifeprüfung ab. Weitere Absagen der Hamburger Universität, die seinerzeit nur wenige Studienplätze für Mediziner zu vergeben hatte, folgten. Ich besuchte dann die Lehranstalt für medizinisch-technische Assistentinnen in Hamburg-St. Georg, die unter Leitung von Prof. Holthusen stand, und legte hier im Oktober 1953 das Staatsexamen für medizinisch-technische Assistentinnen ab. Nachdem ich bakteriologisch, klinisch-chemisch und röntgenologisch gearbeitet hatte, wurde ich von der Agfa AG. als Röntgenlehrassistentin eingestellt und mit Forschungs- und Unterrichtsaufgaben betraut.

Im Sommer 1962 nahm ich das Medizinstudium auf.



LUDWIG MÖLLER
BUCH- UND FOTODRUCK
ERLANGEN · FAHRSTR. 5